

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
28 novembre 2002 (28.11.2002)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
WO 02/095045 A2

(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> : C12P 7/40,  
13/00, C12N 11/00, 9/78 // (C12P 7/40, C12R 1:05)  
(C12P 13/00, C12R 1:05)

(21) Numéro de la demande internationale :  
PCT/FR02/01665

(22) Date de dépôt international : 17 mai 2002 (17.05.2002)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :  
01/06665 21 mai 2001 (21.05.2001) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : ADIS-  
SEO FRANCE S.A.S. [FR/FR]; 42, avenue Aristide  
Briand, F-92160 Antony (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : GROS,  
Georges [FR/FR]; 25, rue du Jubilé, F-92160 Antony  
(FR). GARRAIT, Michel [FR/FR]; 1448 route de  
Coutois, F-69390 Millery (FR). TAILLADES, Jacques  
[FR/FR]; 9, rue des Erables, F-34830 Clapiers (FR). REY,  
Patrick [FR/FR]; route de Clermont l'Hérault, F-34800  
Moureze (FR).

(74) Mandataire : MERIGEALT, Shona; Aventis Crop-  
Science S.A., 14-20, rue Pierre Baizet, B.P. 9163, F-69263  
Lyon Cedex 09 (FR).

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,  
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,

DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,  
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,  
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,  
MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI,  
SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN,  
YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,  
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet  
eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet  
européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR,  
IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ,  
CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN,  
TD, TG).

Déclarations en vertu de la règle 4.17 :

— relative au droit du déposant de demander et d'obtenir un  
brevet (règle 4.17.ii) pour les désignations suivantes AE,  
AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH,  
CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI,  
GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG,  
KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,  
MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD,  
SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ,  
VN, YU, ZA, ZM, ZW; brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW,  
MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet eurasien (AM,  
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT,  
BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC,  
NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,  
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

— relative au droit du déposant de revendiquer la priorité de  
la demande antérieure (règle 4.17.iii) pour les désigna-  
tions suivantes AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,  
BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,  
DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID,  
IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,  
LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ,

[Suite sur la page suivante]

(54) Title: METHOD OF PREPARING ALIPHATIC CARBOXYLIC ACIDS BY ENZYMATIC HYDROLYSIS OF ALIPHATIC  
NITRILE COMPOUNDS

(54) Titre : PROCEDE DE PREPARATION D'ACIDES CARBOXYLIQUES ALIPHATIQUES PAR HYDROLYSE ENZYMA-  
TIQUE DE COMPOSES NITRILES ALIPHATIQUES

(57) Abstract: The invention relates to a novel method of preparing aliphatic carboxylic acids by enzymatic hydrolysis of aliphatic  
nitrile compounds. The inventive method is characterised in that: (a) a biological material having a nitrilase activity is prepared; (b)  
said biological material is immobilised; (c) a nitrile compound is brought into contact with the biological material thus immobilised  
in order to obtain the ammonium salt of the aliphatic carboxylic acid formed; and (d), optionally, the acid formed is purified.

(57) Abrégé : La présente invention concerne un nouveau procédé de préparation d'acides carboxyliques aliphatiques par hydrolyse  
enzymatique de composés nitriles aliphatiques caractérisé en ce que: (a) on prépare un matériel biologique ayant une activité nitrilase;  
(b) on immobilise ledit matériel biologique (c) on met en présence un composé nitrile avec le matériel biologique ainsi immobilisé,  
pour obtenir le sel d'ammonium de l'acide carboxylique aliphatique formé (d) éventuellement, on purifie l'acide formé.

WO 02/095045 A2



OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

- relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv)) pour US seulement
- relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv)) pour US seulement

- relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv)) pour US seulement
- relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv)) pour US seulement

**Publiée :**

- sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

**Procédé de préparation d'acides carboxyliques aliphatiques par hydrolyse  
enzymatique de composés nitriles aliphatiques**

La présente invention concerne un nouveau procédé de préparation d'acides  
5 carboxyliques aliphatiques par hydrolyse enzymatique de composés nitriles aliphatiques.

De nombreux acides carboxyliques aliphatiques ont des applications industrielles, ou sont des précurseurs de composés ayant de telles applications, dans les domaines pharmaceutiques, agrochimiques ou nutritionnels.

A titre d'exemple, on peut citer l'acide 2-hydroxy-4-méthylthiobutyrique (hydroxy-  
10 analogue de la méthionine) largement employé en tant qu'additif alimentaire dans le domaine de l'alimentation animale, notamment l'alimentation des volailles.

D'autre part, les monocyanoacides sont des composés particulièrement utilisés dans l'industrie chimique des polymères.

La plupart des procédés permettant de synthétiser ces composés sont essentiellement des  
15 procédés de synthèse organique faisant intervenir la chimie conventionnelle. En ce qui concerne la synthèse d'acides carboxyliques aliphatiques par hydrolyse des composés nitriles correspondants, on connaît des procédés faisant intervenir des catalyseurs organométalliques. À titre d'exemple, nous pouvons notamment citer ceux faisant intervenir des complexes de métaux de transition tels que le palladium (Paraskewas, 1974, Synthesis: 574), le cobalt (Chin et Kim,  
20 1990, Angew. Chem. Int. Ed. Eng. 29: 523), ou le platine (Bennet et Yoshida, 1973, J. Am. Chem. Soc. 95: 3030) qui ont été employés avec plus ou moins de succès. Néanmoins, l'inconvénient majeur de ces méthodes réside dans l'élaboration complexe et onéreuse du catalyseur organométallique.

De plus en plus de procédés de synthèse organique font intervenir la biocatalyse. De  
25 nombreuses études ont porté sur les enzymes à pouvoir hydrolytique appelées plus communément les hydrolases (lipases, estérases et acylases), notamment pour leur aptitude à bioconvertir un grand nombre de substrats naturels ou non-naturels dans des conditions opératoires identiques (Zhu et Telford, 1990, Tetrahedron 46: 6587; Santaniello et al., 1992, Chem. Rev. 92, 1071).

30 Comparativement, un faible nombre d'enzymes catalysant l'hydrolyse (nitrilase) ou l'hydratation (nitrile hydratase) des nitriles en acides carboxyliques ou amides a été identifié. Cependant, de telles enzymes constituent des réactifs importants pouvant être employés dans des biocatalyseurs destinés à la synthèse d'acides carboxyliques ayant des applications dans les domaines agrochimique, pharmaceutique ou nutritionnel. Un autre avantage des enzymes

nitrilasiques est leur remarquable tolérance vis-à-vis des groupes fonctionnels (de Raadt et al., 1991, Tetrahedron Lett. 32: 341). De plus, les conditions expérimentales et les réactifs généralement employés sont dénués de toxicité et peuvent donc être engagés dans des schémas de synthèse de composés à visée pharmaceutique ou agrochimique.

5 Il est connu que certaines nitrilases convertissent efficacement différents types de nitriles. En particulier, la nitrilase de la bactérie *Alcaligenes faecalis* ATCC 8750 est capable de produire de l'acide R-(-)-mandélique à partir de mandélonitrile racémique (Yamamoto et al., 1991, Appl. Environ. Microbiol. 57(10): 3028-3032). De part cette activité, cette enzyme était réputée pour avoir une forte affinité pour les nitriles benzyliques, et donc pour être une arylacétonitrilase  
10 (Yamamoto et al., 1992, J. Ferm. Bioeng. 73: 425). D'autres nitrilases, par exemple la nitrilase de la bactérie *Comamonas testosteroni*, ont été identifiées pour leur capacité à hydrolyser les nitriles aliphatiques (Levy-Schil et al., 1995, Gene 161(1): 15-20).

Par ailleurs, on connaît de la demande de brevet WO 98/18941 l'utilisation de la nitrilase d'*Alcaligenes faecalis* ATCC 8750 pour la conversion par hydrolyse enzymatique du 2-hydroxy  
15 4-méthylthio butyronitrile en acide 2-hydroxy 4-méthylthio butyrique et/ou son sel d'ammonium.

La nitrilase de la bactérie *Alcaligenes faecalis* ATCC 8750 est donc particulièrement efficace, mais aucun procédé connu n'a jusqu'alors permis de généraliser son utilisation  
20 industrielle à un grand nombre de nitriles. Toutefois, de nombreux autres acides carboxyliques aliphatiques ont des applications industrielles, et aucun procédé de synthèse de ces autres composés par biocatalyse n'a été développé. La présente invention a pour but de pallier cet inconvénient en proposant un système efficace de synthèse enzymatique d'acides carboxyliques aliphatiques variés à partir de leurs nitriles correspondants, mettant en œuvre la nitrilase  
25 d'*Alcaligenes faecalis* ATCC 8750.

**Description**

La présente invention concerne un procédé de préparation d'acides carboxyliques aliphatiques, à l'exception de l'hydroxyanalogue de la méthionine, par hydrolyse enzymatique de composés nitriles aliphatiques, à l'exception du 2-hydroxy 4-méthylthio butyronitrile, caractérisé en ce que:

- (a) on prépare un matériel biologique ayant une activité nitrilase, ladite activité étant obtenue à partir d'une nitrilase d'une bactérie du genre *Alcaligenes*,
- (b) on immobilise ledit matériel biologique,
- (c) on met en présence un composé nitrile avec le matériel biologique ainsi immobilisé,
- 10 pour obtenir le sel d'ammonium de l'acide carboxylique aliphatique formé,
- (d) éventuellement, on purifie l'acide formé

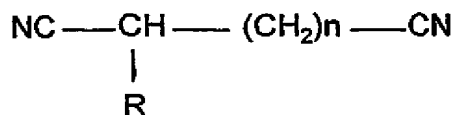
Selon l'invention, on entend par acide carboxylique aliphatique tous les acides carboxyliques aliphatiques à l'exception de l'hydroxyanalogue de la méthionine. De même, on entend par composés nitriles aliphatiques tous les nitriles aliphatiques à l'exception du 2-hydroxy 4-méthylthio butyronitrile.

Selon un mode particulier de réalisation de l'invention, les composés nitriles aliphatiques hydrolysés par le procédé selon l'invention sont des dérivés O-substitués du 2-hydroxy 4-méthylthio butyronitrile, et les acides formés sont des dérivés O-substitués de l'hydroxyanalogue de la méthionine. De préférence, les dérivés O-substitués du 2-hydroxy 4-méthylthio butyronitrile sont des dérivés O-acétylés ou O-hydroxyalkylés.

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, les composés nitriles aliphatiques hydrolysés par le procédé selon l'invention sont des nitriles multi-fonctionnels sélectionnés parmi les nitriles aliphatiques, les nitriles vinyliques, les nitrile-esters, les nitrile-ester allyliques, et les nitrile-éther. Par nitriles multi-fonctionnels, on entend les nitrile possédant une fonction nitrile et au moins une fonction supplémentaire autre que nitrile.

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, les composés nitriles aliphatiques hydrolysés par le procédé selon l'invention sont des dinitriles aliphatiques symétriques ou dissymétriques et les acides formés sont des cyanoacides. A titre d'exemple, les dinitriles aliphatiques symétriques peuvent être le malononitrile, l'adiponitrile, le fumaronitrile, ou le 1,4-

dicyanobut-2-ène. A titre de dinitriles aliphatiques dissymétriques, on peut citer les 2-alkyl et les 2-aryl dinitriles aliphatiques de structure générale:



5 dans laquelle: n est un nombre entier quelconque, et

R est un groupe alkyl, un groupe aryl ou une chaîne multifonctionnelle.

Selon un mode particulier de réalisation de l'invention, les dinitriles aliphatiques dissymétriques sont le 2-méthylglutaronitrile, le 2-méthylsuccinonitrile, ou le 2-méthyladiponitrile.

10 D'une manière générale, l'homme du métier saura adapter le procédé selon l'invention à tout type de dinitrile, en particulier à tout dinitrile dissymétrique.

Lorsque le procédé selon l'invention s'applique aux dinitriles dissymétriques tels que décrits ci-dessus, l'hydrolyse du dinitrile en cyanoacide s'effectue sur de la fonction nitrile la moins encombrée stériquement.

15

L'étape (a) du procédé selon l'invention consiste à préparer un matériel biologique ayant une activité nitrilase, ladite activité étant obtenue à partir d'une nitrilase d'une bactérie du genre *Alcaligenes*.

20 Le matériel biologique peut consister en des cellules entières, vivantes ou mortes, ou des cellules brisées ayant une activité nitrilase. Elle peut aussi consister en une solution enzymatique comprenant une enzyme à activité nitrilase purifiée ou non.

Avantageusement, on utilise un microorganisme exprimant une nitrilase.

Selon un mode particulier de réalisation de l'invention, on utilise un microorganisme transformé exprimant une nitrilase recombinante.

25 De manière préférentielle, l'activité nitrilase provient de la bactérie *Alcaligenes faecalis* ATCC 8750.

Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, le microorganisme transformé utilisé est une bactérie *Escherichia coli* exprimant le gène nitB d'*Alcaligenes faecalis* ATCC 8750, telle que décrite dans la demande de brevet WO 98/18941.

30

L'étape (b) du procédé consiste à immobiliser le matériel biologique. Cette immobilisation se fait avantageusement en présence d'un support solide et permet d'obtenir des particules solides dont la taille, la forme et la résistance mécanique peuvent être contrôlées. Elle offre également la possibilité d'employer simultanément un polymère de polyazétidine ou d'autres agents réticulants.

Ce procédé d'immobilisation peut faire intervenir des cellules entières ou perméabilisées, en particulier des cellules d'*E. coli* selon l'invention. Il peut aussi s'appliquer à une solution enzymatique de nitrilases selon l'invention exempte de cellules.

Le procédé d'immobilisation consiste à immobiliser le matériel biologique actif sur un support solide, de granulométrie notamment comprise entre 1  $\mu\text{m}$  et 500  $\mu\text{m}$ , de préférence 10  $\mu\text{m}$  et 200  $\mu\text{m}$ , grâce à des agents chimiques réagissant avec les fonctions amine ( $\text{NH}_2$ ,  $\text{NH}$ ), carboxyle ( $\text{COOH}$ ), hydroxy ( $\text{OH}$ ), thiol ( $\text{SH}$ ) ou amide ( $\text{CONH}_2$ ) de l'agent biologique et du support. Ces agents chimiques permettent aussi d'insolubiliser dans l'eau le matériel biologique et le support. La masse obtenue est très malléable et peut être mise en forme afin d'obtenir des particules de forme et de taille souhaitées. La cohésion et la dureté de ces particules sont ensuite obtenues par séchage.

Le matériel biologique à immobiliser peut éventuellement contenir également un matériel biologique inactif présent à raison de 0 à 200 % en poids. Ce matériel inactif biologique peut être des protéines (albumine, gélatine) ou des polysaccharides (Chitosan, k-carraghénane, alginate).

Le support solide, sur lequel sont déposés le matériel biologique, et éventuellement le polymère, peut se composer de particules organiques ou inorganiques, poreuses ou non poreuses, hydrophiles ou hydrophobes. Parmi ces particules on peut signaler, sans que cela ne soit limitatif:

- les résines échangeuses d'ions,
- l'alumine,
- les silices de synthèse ou diatomées et les gels de silice,
- les zéolites,
- les charbons,
- les protéines partiellement solubles ou insolubles dans l'eau, comme le gluten,
- les polysaccharides, comme l'amidon.

Le support solide peut constituer de 0,01 à 200 % en poids du matériel biologique et de préférence de 10 à 100 %.

Les agents chimiques utilisés pour insolubiliser le matériel biologique peuvent être des polymères ou des molécules bi-fonctionnalisées qui réagissent avec les fonctions amine (NH<sub>2</sub>, NH), carboxylique (COOH), hydroxy (OH), thiol (SH), amide (CONH<sub>2</sub>). A titre d'exemple, on peut citer :

- 5                   - les polymères de polyazétidine,
- les polymères de polyéthylènimine,
- les polymères de polyamide,
- les polymères d'isocyanates,
- les gels d'alginate,
- 10               - les gels de k-carraghénane,
- les amines comme l'hexaméthylène diamine,
- les aldéhydes comme le glutaraldéhyde,
- les acides carboxyliques comme l'acide adipique, et
- les isocyanates.

15

Le procédé d'immobilisation peut faire intervenir un ou plusieurs de ces agents chimiques. L'agent chimique est ajouté selon une concentration comprise entre 1 et 50 % en poids par rapport au matériel biologique et au support. On préférera une quantité comprise entre 5 et 30 % afin d'obtenir des particules suffisamment solides et qui conservent une activité importante et qui ne présentent pas trop de problèmes de diffusion interne.

20

La durée du traitement de réticulation est comprise entre 0,5 et 24 heures.

La température du procédé est généralement comprise entre 4 et 65°C. On préférera une température comprise entre 20 et 40°C. La température employée lors du procédé d'immobilisation peut être aussi très dépendante de la stabilité du matériel biologique employé.

25

Le pH durant la phase d'immobilisation est maintenu entre 5 et 11. On préférera un pH compris entre 6 et 10 avec une préférence vers les pH alcalins. Le pH est aussi choisi en fonction de la résistance du matériel biologique et sera aisément déterminé par l'homme du métier.

De manière préférée, le procédé selon l'invention est caractérisé en ce que le rapport entre la masse de matériel biologique immobilisé et la masse de substrat est compris entre 0,1 et 10.

30

La mise en forme du matériel biologique immobilisé doit permettre son emploi dans un système quelconque, notamment dans un lit fixe.

Une méthode de formulation peut être l'extrusion. Pour ce faire, le matériel biologique et le support sont réticulés par ajout d'un ou plusieurs agents chimiques. Après traitement, la masse



insoluble est récupérée par centrifugation ou après floculation et filtration. Un taux de matière sèche d'au moins 10% est préféré. La masse est ensuite extrudée. Par cette méthode, on obtient de préférence des vermicelles de diamètre compris entre 0,3 et 0,5 mm et d'une longueur comprise entre 1 et 10 mm. Ces vermicelles peuvent être sphéronisés. Les particules obtenues sont ensuite séchées.

Une autre méthode de formulation peut être le pelliculage ("spray coating"). Pour ce faire, le matériel biologique est mélangé avec un ou plusieurs agents chimiques. Après réaction, le mélange est pulvérisé sur le support sous forme d'une couche mince. Par cette méthode, on obtient des granulés de diamètre moyen compris entre 0,1 et 2 mm.

Les particules obtenues peuvent éventuellement être ensuite plongées dans une solution d'un agent réducteur comme le borohydrure de sodium afin de réduire les fonctions imines formées lors de la réticulation.

Les particules obtenues sont suffisamment solides et résistantes à l'attrition pour être employées dans un lit-fixe, un lit fluidisé ou un réacteur agité.

L'étape (c) du procédé selon l'invention consiste à mettre en œuvre le matériel biologique immobilisé dans une ou plusieurs colonnes ou réacteurs. Le but de cette étape est de pouvoir produire en continu les acides carboxyliques aliphatiques à partir des composés nitriles aliphatiques.

La ou les colonnes ou réacteurs sont alimentés par une solution pure ou diluée d'un composé nitrile aliphatique.

La ou les colonnes ou réacteurs sont mises en œuvre de préférence à une température comprise entre 10 et 60°C et à un pH compris entre 5 et 9.

Le système mis en œuvre peut être constitué de deux ou plusieurs colonnes connectées l'une à l'autre en série.

Selon une première manière de mettre en œuvre l'invention, l'alimentation de la solution aqueuse du composé nitrile aliphatique est réalisée en tête de la première colonne avec une alimentation simultanée d'autres colonnes avec la solution du composé nitrile aliphatique en une quantité limitée à la solubilité de ce composé dans le mélange réactionnel ; ce système est intitulé système étagé.

Selon une deuxième manière de mettre en œuvre l'invention, on utilise une ou plusieurs colonnes connectées l'une à l'autre en parallèle dans une boucle de circulation. Selon cette installation, le composé nitrile aliphatique en solution aqueuse alimente la boucle en continu, et

le milieu de réaction est pompé en continu de façon à conserver un volume constant dans ladite boucle; ce système est intitulé système boucle.

Le type de réacteur utilisé dans cette invention peut être du type lit fixe, lit fluide, ou du type agité en continu. On préfère utiliser les réacteurs du type lit fixe parce qu'ils réduisent les problèmes d'attrition qui peuvent être rencontrés avec les particules de cellules immobilisées. Lorsque le matériel biologique consiste en un microorganisme entier, on préférera utiliser un réacteur agité couplé à un module d'ultrafiltration pour séparer de façon continue le microorganisme du produit d'intérêt.

L'étape (d), facultative, consiste à purifier l'acide formé. A titre d'exemple, une méthode de purification de l'acide formé est donnée. L'homme du métier saura identifier ou adapter d'autres méthodes de purification au procédé selon l'invention. Dans un premier temps, le matériel biologique immobilisé peut être récupéré par simple filtration. La phase aqueuse peut ensuite être concentrée à l'aide d'un évaporateur, puis extraite à l'aide d'un solvant organique. La phase organique est alors séchée puis évaporée. La phase aqueuse restante est ensuite concentrée au maximum, et le résidu obtenu est mis en suspension dans un solvant polaire. Les sels insolubles de l'acide formé sont filtrés puis la solution est séchée, filtrée et évaporée. L'ensemble de ces opérations permet d'extraire l'acide, éventuellement l'amide formée et le nitrile non converti. D'autres méthodes de purification de sont par exemple décrites dans la demande de brevet WO 98/18941.

Les exemples ci-après permettent d'illustrer la présente invention, sans toutefois en limiter la portée.

## 5 Exemples

### Exemple 1: Protocole général de l'hydrolyse enzymatique des nitriles

Le substrat est mis en suspension dans 750 mL d'eau millipore thermostatée à 30°C et tamponnée par  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  et  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  à  $\text{pH} = 7,3$ . L'agitation est maintenue constante à 250 rpm pendant toute la durée de l'essai. La quantité du matériel biologique immobilisé est ensuite additionnée de façon que  $M_{\text{catalyseur}} / M_{\text{substrat}} = 0,55$ . Le degré d'avancement de la réaction est déterminé par chromatographie HPLC ou CPG. La réaction terminée, le matériel biologique immobilisé est récupéré par simple filtration. La phase aqueuse est ensuite concentrée à l'évaporateur rotatif jusqu'à 200 mL environ puis acidifiée par de l'HCl 36% jusqu'à  $\text{pH} = 1,5$ . La phase aqueuse est extraite à l'acétate d'éthyle ou à l'éther. La phase organique est séchée sur  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  puis évaporée. La phase aqueuse est concentrée au maximum. Le résidu obtenu est mis en suspension dans du méthanol. Les sels insolubles sont filtrés puis la solution méthanolique est séchée sur  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtrée et évaporée. L'ensemble des opérations permet d'extraire l'acide, éventuellement l'amide formée et le nitrile non converti.

### 20 Exemple 2: Hydrolyse enzymatique des précurseurs de dérivés O-substitués de l'hydroxyanalogue de la méthionine

#### Exemple 2.1: Synthèse de l'acide ( $\pm$ )-2-acétoxy-4-méthylthiobutanoïque (Composé 1)

Dans un réacteur parfaitement agité à 250 rpm, thermostaté à 30°C, 13,0 g (0,075 mole) du ( $\pm$ )-2-acétoxy-4-méthylthiobutyronitrile sont introduits dans 750 mL d'eau millipore tamponnée à  $\text{pH} = 7,3$ . 7,15 g de matériel biologique immobilisé sont ensuite additionnés. Le suivi cinétique est réalisé par HPLC (éluant: eau / acétonitrile 80/20 (v/v) / 0,05% (v/v) d'acide trifluoroacétique (TFA);  $\lambda = 210$  nm; Débit = 1 mL/min; colonne: Nucléosil RP C18 (5  $\mu\text{m}$ , 100 Å). Le mélange est laissé sous agitation à 30°C pendant 48 heures. Le rendement obtenu, après 48 heures, est de 89% en acide ( $\pm$ )-2-acétoxy-4-méthylthiobutanoïque (Composé 1a). L'analyse RMN  $^1\text{H}$  révèle la présence de 6% molaire d'acide ( $\pm$ )-2-hydroxy-4-méthylthiobutanoïque (Composé 1b).  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{DMSO } d_6$ )  $\delta_{\text{H}}$  ppm: 1,75 (m, 2H,  $\text{S-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$ ), 1,79 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{-}$ ), 1,84 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{-S-}$ ), 2,28 (t, 2H,  $\text{CH}_3\text{-S-CH}_2\text{-}$ ), 4,69 (td, 1H,  $\text{-CH(OAc)CN}$ ), 11,9 (s, 1H,  $\text{CO}_2\text{H}$ ).

$^{13}\text{C}$  RMN (DMSO  $d_6$ )  $\delta_c$  ppm: 15,24 ( $\text{CH}_3\text{-S}$ ), 21,17 ( $\text{CH}_3\text{-CO}$ ), 29,73 ( $\text{CH}_3\text{-S-CH}_2$ ), 30,96 ( $\text{S-CH}_2\text{-CH}_2$ ), 71,35 ( $-\text{CH}(\text{OAc})\text{CN}$ ), 170,77 ( $\text{CH}_3\text{-COO}$ ), 171,86 ( $\text{CO}_2\text{H}$ ). IR ( $\text{CHCl}_3$ )  $\text{cm}^{-1}$ : 2500-3500, 1745, 1720. Masse FAB $^-$  (NBA): m/e (intensité relative) 191 (100), 149 (70), 59 (25).

5. **Exemple 2.2: Synthèse de l'acide ( $\pm$ )-2-(1-éthoxyéthoxy)-4-méthylthiobutanoïque (Composé 2)**

Le protocole opératoire est identique à celui décrit à l'exemple 2.1. Les quantités introduites sont les suivantes: 3,0 g (0,022 mole) du ( $\pm$ )-2-(1-éthoxyéthoxy)-4-méthylthiobutyronitrile et 3,0 g de matériel biologique immobilisé dans 220 mL d'eau millipore. Le suivi cinétique est réalisé par HPLC (éluant: eau / acétonitrile 95/5 (v/v) / 0,05% (v/v) de TFA). Le rendement obtenu, après 25 heures, est de 93% en acide ( $\pm$ )-2-(1-éthoxyéthoxy)-4-méthylthiobutanoïque (Composé 2a).  $^1\text{H}$  RMN (DMSO  $d_6$ )  $\delta_H$  ppm: 1,09 (td, 3H,  $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-O}$ ), 1,18 (dd, 3H,  $\text{CH}_3\text{-CH}$ ), 1,72-1,84 (m, 2H,  $-\text{S-CH}_2\text{-CH}_2-$ ), 2,10 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{-S}$ ), 2,52 (t, 2H,  $\text{S-CH}_2\text{-CH}_2$ ), 3,51 (m, 2H,  $\text{O-CH}_2\text{-CH}_3$ ), 3,84 (m, 1H,  $\text{O-CH-CO}_2\text{H}$ ), 4,72 (qd, 1H,  $-\text{O-CH}(\text{CH}_3)\text{-O}$ ).  $^{13}\text{C}$  RMN (DMSO  $d_6$ )  $\delta_c$  ppm: 15,42 ( $\text{CH}_3\text{-S}$ ), 16,1 ( $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-O}$ ), 21,32 ( $\text{CH}_3\text{-CH}$ ), 30,07 ( $\text{S-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}$ ), 33,89 ( $\text{S-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}$ ), 62,00 ( $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-O}$ ), 77,06 ( $\text{CH}(\text{CO}_2\text{H})\text{-O}$ ), 99,49 ( $-\text{O-CH}(\text{CH}_3)\text{-O}$ ), 176,42 ( $\text{CO}_2\text{H}$ ). IR ( $\text{CHCl}_3$ )  $\text{cm}^{-1}$ : 2500-3500, 1725. Masse FAB $^-$  (NBA): m/e (intensité relative) 221 (100), 152 (40), 122 (30), 46 (65).

20 **Exemple 2.3: Synthèse de l'acide ( $\pm$ )-2-méthoxyméthoxy-4-méthylthiobutanoïque (Composé 3)**

Le protocole opératoire est identique à celui décrit à l'exemple 2.1. Les quantités introduites sont les suivantes: 3,80 g (0,022 mole) du ( $\pm$ )-2-méthoxyméthoxy-4-méthylthiobutyronitrile et 2,10 g de matériel biologique immobilisé dans 220 mL d'eau millipore. Le suivi cinétique est réalisé selon les mêmes conditions d'élution que celui décrit à l'exemple 2.1. Le rendement obtenu, après 120 heures, est de 70% en acide ( $\pm$ )-2-méthoxyméthoxy-4-méthylthiobutanoïque (Composé 3a).  $^1\text{H}$  RMN (DMSO  $d_6$ )  $\delta_H$  ppm: 1,96 (m, 2H,  $\text{S-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}$ ), 2,05 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{-S-CH}_2$ ), 2,59 (t, 2H,  $-\text{S-CH}_2\text{-CH}_2$ ), 3,31 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{-O}$ ), 3,91 (m, 1H,  $\text{O-CH-CO}_2\text{H}$ ), 4,60-4,72 (dd, 2H,  $\text{O-CH}_2\text{-O}$ ), 11,32 ( $\text{CO}_2\text{H}$ ).  $^{13}\text{C}$  RMN (DMSO  $d_6$ )  $\delta_c$  ppm: 15,37 ( $\text{CH}_3\text{-S}$ ), 30,80 ( $\text{CH}_3\text{-S-CH}_2$ ), 33,60 ( $\text{S-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}$ ), 55,74 ( $\text{CH}_3\text{-O}$ ), 76,55 ( $\text{O-CH-CO}_2\text{H}$ ), 95,44 ( $\text{O-CH}_2\text{-O}$ ), 176,13 ( $\text{CO}_2\text{H}$ ). IR ( $\text{CHCl}_3$ )  $\text{cm}^{-1}$ : 1720. Masse FAB $^-$  (NBA): m/e (intensité relative) 193 (70), 149 (55), 115 (20), 46 (100).

Les résultats des exemples 2.1 à 2.3 sont compilés dans le Tableau 1 ci-dessous.

**Tableau 1: Hydrolyse enzymatique des précurseurs de dérivés O-substitués de l'hydroxyanalogue de la méthionine**

Substrat	Conditions <sup>a</sup>	Produit formé	Rendement (%) <sup>b</sup>
1	0,55 (33)	1a (1b)	82 (6)
2	0,55 (115)	2a	93
3	0,55 (120)	2a	70

<sup>a</sup> Equivalents de matériel biologique immobilisé /substrat (w/w); temps de réaction (h)

<sup>b</sup> Rendement en acide obtenu après extraction puis purification

5

### Exemple 3: Hydrolyse enzymatique de composés nitriles bi-fonctionnels

#### Exemple 3.1: Hydrolyse enzymatique de l'isobutyronitrile (Composé 4)

Le protocole opératoire est identique à celui décrit à l'exemple 2.1. Les quantités introduites sont les suivantes: 5,21 g (0,075 mole) d'isobutyronitrile commercial et 2,86 g de matériel biologique immobilisé sont ensuite additionnés. Le rendement obtenu, après 58 heures, est de 71% en acide isobutyrique. <sup>1</sup>H RMN (DMSO d<sub>6</sub>) δ<sub>H</sub> ppm: 1,05 (d, 6H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-CH), 2,40 (h, 1H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-CH), 11,74 (s, 1H, CO<sub>2</sub>H). <sup>13</sup>C RMN (DMSO d<sub>6</sub>) δ<sub>C</sub> ppm: 19,61 ((CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-CH), 33,90 (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-CH, 178,7 (s, 1H, CO<sub>2</sub>H). IR (CHCl<sub>3</sub>) cm<sup>-1</sup>: 2500-3500, 1715. Masse FAB<sup>-</sup> (GT): m/e (intensité relative) 87 (100), 79 (20).

#### Exemple 3.2: Hydrolyse enzymatique de l'acrylonitrile (Composé 5)

Le protocole opératoire est identique à celui décrit à l'exemple 2.1. Les quantités introduites sont les suivantes: 4,0 g (0,075 mole) d'acrylonitrile commercial et 2,30 g de matériel biologique immobilisé. Le rendement obtenu, après 9 heures, est de 93% en acide acrylique. L'analyse RMN révèle la présence de 0,8% molaire d'acrylamide. <sup>1</sup>H RMN (DMSO d<sub>6</sub>) δ<sub>H</sub> ppm: 5,90-6,13 (m, 2H, CH<sub>2</sub>=CH), 6,32 (dd, 1H, CH<sub>2</sub>=CH), 12,43 (s, 1H, CO<sub>2</sub>H). <sup>13</sup>C RMN (DMSO d<sub>6</sub>) δ<sub>C</sub> ppm: 130,7 (CH<sub>2</sub>=CH), 131,45 (CH<sub>2</sub>=CH), 171,16 (CO<sub>2</sub>H). IR (CHCl<sub>3</sub>) cm<sup>-1</sup>: 2500-3500, 1695. Masse FAB<sup>-</sup> (GT): m/e (intensité relative) 71 (70), 53 (20).

25

#### Exemple 3.3: Hydrolyse enzymatique du (±)-2-acétoxy-3-butènenitrile (Composé 6)

Le protocole opératoire est identique à celui décrit à l'exemple 2.1. Les quantités introduites sont les suivantes: 9,40 g (0,075 mole) du (±)-2-acétoxy-3-butènenitrile commercial et 5,20 g de matériel biologique immobilisé sont ensuite additionnés. Le rendement obtenu, après

27 heures, est de 92% en acide ( $\pm$ )-2-acétoxybut-3-énoïque. L'analyse RMN révèle la présence de 6% molaire de l'acide ( $\pm$ )-2-hydroxy-but-3-énoïque.  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{DMSO } d_6$ )  $\delta_{\text{H}}$  ppm: 2,01 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{-CO}_2$ ), 4,87-5,25 (m, 3H,  $\text{CH}_2=\text{CH-CH}$ ), 5,93-6,01 (m, 1H,  $\text{CH}_2=\text{CH-CH}$ ), 12,33 ( $\text{CO}_2\text{H}$ ).  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{DMSO } d_6$ )  $\delta_{\text{C}}$  ppm: 21,77 ( $\text{CH}_3\text{-CO}_2$ ), 76,69 ( $\text{CH}_2=\text{CH-CH}$ ), 115,12 ( $\text{CH}_2=\text{CH}$ ), 135,59 ( $\text{CH}_2=\text{CH}$ ), 171,24 ( $\text{CH}_3\text{-CO}_2$ ), 176,86 ( $\text{CO}_2\text{H}$ ). IR ( $\text{CHCl}_3$ )  $\text{cm}^{-1}$ : 2500-3500, 1740, 1715. Masse  $\text{FAB}^-$  (GT): m/e (intensité relative) 143 (100), 59 (30).

**Exemple 3.4: Hydrolyse enzymatique du ( $\pm$ )-2-(1-éthoxyéthoxy)-but-3-ènenitrile (Composé 7)**

Le protocole opératoire est identique à celui décrit à l'exemple 2.1. Les quantités introduites sont les suivantes: 7,8 g (0,05 mole) du ( $\pm$ )-2-(1-éthoxyéthoxy)-but-3-ènenitrile et 4,5 g de matériel biologique immobilisé dans 500 mL d'eau millipore. Le rendement obtenu, après 26 heures, est de 86% en acide ( $\pm$ )-2-(1-éthoxyéthoxy)-but-3-énoïque.  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{DMSO } d_6$ )  $\delta_{\text{H}}$  ppm: 1,06 (t, 3H,  $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-O}$ ), 1,19 (d, 3H,  $\text{CH}_3\text{-CH}$ ), 3,40-3,55 (m, 2H,  $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-O}$ ), 4,32 (m, 1H,  $\text{CH}_2=\text{CH-CH}$ ), 4,75-4,66 (qd, 1H,  $\text{O-CH-O}$ ), 4,95-5,2 (m, 2H,  $\text{CH}_2=\text{CH-}$ ), 5,78-5,91 (m, 1H,  $\text{CH}_2=\text{CH}$ ), 12,32 (s, 1H,  $\text{CO}_2\text{H}$ ).  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{DMSO } d_6$ )  $\delta_{\text{C}}$  ppm: 15,94 et 16,06 ( $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-O}$ ), 20,75 et 21,15 ( $\text{CH}_3\text{-CH}$ ), 60,24 et 61,10 ( $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-O}$ ), 78,61 et 78,92 ( $\text{CH}_2=\text{CH-CH}$ ), 98,31 et 98,87 ( $\text{O-CH-O}$ ), 113,86 et 115,0 ( $\text{CH}_2=\text{CH-}$ ), 138,25 et 138,56 ( $\text{CH}_2=\text{CH}$ ), 174,56 ( $\text{CO}_2\text{H}$ ). IR ( $\text{CHCl}_3$ )  $\text{cm}^{-1}$ : 2500-3500, 1725. Masse  $\text{FAB}^-$  (GT): m/e (intensité relative) 173 (100), 43 (35).

**Exemple 3.5: Hydrolyse enzymatique du ( $\pm$ )-2-méthoxyméthoxy-but-3-ènenitrile (Composé 8)**

Le protocole opératoire est identique à celui décrit à l'exemple 2.1. Les quantités introduites sont les suivantes: 3,81 g (0,030 mole) du ( $\pm$ )-2-méthoxyméthoxy-but-3-ènenitrile et 4,5 g de matériel biologique immobilisé dans 300 mL d'eau millipore. Le rendement obtenu, après 47 heures, est de 80% en acide ( $\pm$ )-2-méthoxyméthoxy-but-3-énoïque.  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{DMSO } d_6$ )  $\delta_{\text{H}}$  ppm: 3,30-3,95 (m, 3H,  $\text{CH}_3\text{-O}$ ), 4,37 (m, 1H,  $\text{CH}_2=\text{CH-CH}$ ), 4,62-4,71 (dd,  $\text{O-CH}_2\text{-O}$ ), 5,07-5,23 (m, 2H,  $\text{CH}_2=\text{CH-}$ ), 5,91-5,98 (m, 1H,  $\text{CH}_2=\text{CH}$ ), 11,47 (s, 1H,  $\text{CO}_2\text{H}$ ).  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{DMSO } d_6$ )  $\delta_{\text{C}}$  ppm: 55,58 ( $\text{CH}_3\text{-O}$ ), 78,87 ( $\text{CH}_2=\text{CH-CH}$ ), 94,62 ( $\text{O-CH}_2\text{-O}$ ), 114,38 ( $\text{CH}_2=\text{CH-}$ ), 138,11 ( $\text{CH}_2=\text{CH}$ ), 173,67 (s, 1H,  $\text{CO}_2\text{H}$ ). IR ( $\text{CHCl}_3$ )  $\text{cm}^{-1}$ : 2500-3500, 1725. Masse  $\text{FAB}^-$  (GT): m/e (intensité relative) 193 (100)

**Exemple 3.6: Hydrolyse enzymatique du 2-cyanoacétate d'éthyle (Composé 9)**

Le protocole opératoire est identique à celui décrit à l'exemple 2.1. Les quantités introduites sont les suivantes: 8,50 g (0,075 mole) du 2-cyanoacétate d'éthyle et 4,7 g de matériel

biologique immobilisé sont ensuite additionnés. Le rendement obtenu, après 7 heures, est de 94% en acide 2-carbétoxyacétique.  $^1\text{H}$  RMN (DMSO  $d_6$ )  $\delta_H$  ppm: 1,19 (t, 3H,  $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-O}$ ), 3,33 (s, 2H,  $\text{HO}_2\text{C-CH}_2\text{-CO}_2\text{Et}$ ), 4,12 (q, 3H,  $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-O}$ ), 10,71 (s, 1H,  $\text{CO}_2\text{H}$ ).  $^{13}\text{C}$  RMN (DMSO  $d_6$ )  $\delta_C$  ppm: 14,66 ( $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-O}$ ), 42,34 ( $\text{HO}_2\text{C-CH}_2\text{-CO}_2\text{Et}$ ), 64,47 ( $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-O}$ ), 167,7 ( $\text{-CO}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$ ), 168,9 ( $\text{CO}_2\text{H}$ ). IR ( $\text{CHCl}_3$ )  $\text{cm}^{-1}$ : 2500-3500, 1745, 1725. Masse  $\text{FAB}^-$  (GT): m/e (intensité relative) 131 (65), 104 (40), 87 (100), 41 (25).

Les résultats des exemples 3.1 à 3.6 sont compilés dans le Tableau 2 ci-dessous.

10 **Tableau 2: Hydrolyse enzymatique de composés nitriles bi-fonctionnels**

Substrat	Temps de réaction (h)	Rendement (%) <sup>a</sup>
4	58	71
5	9	93
6	27	92
7	25	86
8	47	80
9	7	94

<sup>a</sup> Rendement en acide extrait après bioconversion totale du nitrile (excepté pour le nitrile 4)

#### Exemple 4: Hydrolyses enzymatiques de dinitriles

##### Exemple 4.1: Hydrolyse enzymatique du malononitrile (Composé 10)

Le protocole opératoire est identique à celui décrit à l'exemple 2.1. Les quantités introduites sont les suivantes: 5,0 g (0,075 mole) de malononitrile commercial et 2,75 g de matériel biologique immobilisé. Le rendement obtenu, après 51 heures, est de 87% en acide 2-cyanoacétique (Composé 10a).  $^1\text{H}$  RMN (DMSO  $d_6$ )  $\delta_H$  ppm: 3,57 (s, 2H,  $\text{-CH}_2\text{-}$ ), 11,57 (s, 1H,  $\text{CO}_2\text{H}$ ).  $^{13}\text{C}$  RMN (DMSO  $d_6$ )  $\delta_C$  ppm: 25,46 ( $\text{CH}_2\text{-CN}$ ), 115,4 ( $\text{CN}$ ), 165,6 ( $\text{CO}_2\text{H}$ ). IR ( $\text{CHCl}_3$ )  $\text{cm}^{-1}$ : 2500-3500, 2240, 1725. Masse  $\text{FAB}^-$  (GT): m/e (intensité relative) 84 (100), 46 (60).

##### Exemple 4.2: Hydrolyse enzymatique de l'adiponitrile (Composé 11)

Le protocole opératoire est identique à celui décrit à l'exemple 2.1. Les quantités introduites sont les suivantes: 8,02 g (0,075 mole) d'adiponitrile commercial et 4,50 g de matériel biologique immobilisé. Le rendement obtenu, après 53 heures, est de 90% en acide 5-

cyanopentanoïque.  $^1\text{H}$  RMN (DMSO  $d_6$ )  $\delta_{\text{H}}$  ppm: 1,60 (m, 2H,  $\text{HO}_2\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ ), 1,62 (m, 2H,  $\text{NC}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ ), 2,23 (t, 2H,  $-\text{CH}_2-\text{CO}_2\text{H}$ ), 2,51 (t, 2H,  $-\text{CH}_2-\text{CN}$ ), 12,41 (s, 1H,  $\text{CO}_2\text{H}$ ).  $^{13}\text{C}$  RMN (DMSO  $d_6$ )  $\delta_{\text{C}}$  ppm: 16,92 ( $\text{NC}-\text{CH}_2-\text{CH}_2$ ), 24,92 ( $\text{NC}-\text{CH}_2-\text{CH}_2$ ), 25,31 ( $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}_2\text{H}$ ), 34,95 ( $\text{CH}_2-\text{CO}_2\text{H}$ ), 121,38 ( $\text{CN}$ ), 176,41 (s, 1H,  $\text{CO}_2\text{H}$ ). IR ( $\text{CHCl}_3$ )  $\text{cm}^{-1}$ : 2500-3500, 2245, 1730.

5 Masse  $\text{FAB}^-$  (GT): m/e (intensité relative) 126 (100).

**Exemple 4.3: Hydrolyse enzymatique du fumaronitrile (Composé 12)**

Le protocole opératoire est identique à celui décrit à l'exemple 2.1. Les quantités introduites sont les suivantes: 5,90 g (0,075 mole) de fumaronitrile commercial et 3,25 g de matériel biologique immobilisé. Le rendement obtenu, après 25 heures, est de 72% en acide 3-cyanoacrylique et de 28% en 3-cyanoacrylamide.

*Acide 3-cyanoacrylique*

$^1\text{H}$  RMN (DMSO  $d_6$ )  $\delta_{\text{H}}$  ppm: 5,84 (d, 1H,  $\text{HO}_2\text{C}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CN}$ ), 6,54 (d, 1H,  $\text{HO}_2\text{C}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CN}$ ), 13,10 (s, 1H,  $\text{CO}_2\text{H}$ ).  $^{13}\text{C}$  RMN (DMSO  $d_6$ )  $\delta_{\text{C}}$  ppm: 115,03 ( $\text{HO}_2\text{C}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CN}$ ), 119,09 ( $\text{CN}$ ), 153,22 ( $\text{HO}_2\text{C}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CN}$ ), 167,13 ( $\text{CO}_2\text{H}$ ). IR ( $\text{CHCl}_3$ )  $\text{cm}^{-1}$ : 2500-3500, 2225, 1695. Masse  $\text{FAB}^-$  (GT): m/e (intensité relative) 96 (100), 52 (10).

*3-cyanoacrylamide*

20  $^1\text{H}$  RMN (DMSO  $d_6$ )  $\delta_{\text{H}}$  ppm: 6,56 (d, 1H,  $\text{H}_2\text{NOC}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CN}$ ), 7,04 (d, 1H,  $\text{H}_2\text{NOC}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CN}$ ), 7,72-7,99 (d, 2H,  $\text{CONH}_2$ ).  $^{13}\text{C}$  RMN (DMSO  $d_6$ )  $\delta_{\text{C}}$  ppm: 109,54 ( $\text{H}_2\text{NOC}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CN}$ ), 117,95 ( $\text{CN}$ ), 144,95 ( $\text{H}_2\text{NOC}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CN}$ ), 164,01 ( $\text{CONH}_2$ ). IR ( $\text{CHCl}_3$ )  $\text{cm}^{-1}$ : 3100-3500, 2235, 1695. Masse  $\text{FAB}^-$  (GT): m/e (intensité relative) 95 (10).

25 **Exemple 4.4: Hydrolyse enzymatique du 1,4-dicyanobut-2-ène (Composé 13)**

Le protocole opératoire est identique à celui décrit à l'exemple 2.1. Les quantités introduites sont les suivantes: 5,30 g (0,05 mole) de 1,4-dicyanobut-2-ène commercial et 3,0 g de matériel biologique immobilisé dans 500 mL d'eau millipore. Le rendement obtenu, après 25 heures, est de 82% en acide 5-cyanopent-3-énoïque.  $^1\text{H}$  RMN (DMSO  $d_6$ )  $\delta_{\text{H}}$  ppm: 3,04 (dd, 2H,  $\text{HO}_2\text{C}-\text{CH}_2$ ), 3,31 (dd, 2H,  $\text{CH}_2-\text{CN}$ ), 5,51 (td, 1H,  $\text{NC}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{}$ ), 5,82 (td, 1H,  $\text{H}_2\text{OC}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{}$ ), 10,51 (s, 1H,  $\text{CO}_2\text{H}$ ).  $^{13}\text{C}$  RMN (DMSO  $d_6$ )  $\delta_{\text{C}}$  ppm: 20,34 ( $\text{CH}_2-\text{CN}$ ), 38,14 ( $\text{H}_2\text{OC}-\text{CH}_2$ ), 119,44 ( $\text{CN}$ ), 122,21 ( $\text{NC}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{}$ ), 128,75 ( $\text{H}_2\text{OC}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{}$ ), 173,44 ( $\text{CO}_2\text{H}$ ). IR ( $\text{CHCl}_3$ )  $\text{cm}^{-1}$ : 2500-3500, 2255, 1725. Masse  $\text{FAB}^-$  (GT): m/e (intensité relative) 124 (100), 80 (25), 46 (30).



**Exemple 4.5: Hydrolyse enzymatique du 2-méthylglutaronitrile (Composé 14)**

Le protocole opératoire est identique à celui décrit à l'exemple 2.1. Les quantités introduites sont les suivantes: 8,27 g (0,075 mole) de 2-méthylglutaronitrile commercial et 4,56 g de matériel biologique immobilisé. Le rendement obtenu, après 96 heures, est de 91% en acide 4-cyanopentanoïque. <sup>1</sup>H RMN (DMSO d<sub>6</sub>) δ<sub>H</sub> ppm: 1,23 (d, 3H, CH<sub>3</sub>-CH), 1,79 (td, 2H, NC-CH(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>-), 2,35 (td, 2H, -CH<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>H), 2,84 (m, 2H, -CH-CN), 10,89 (s, 1H, CO<sub>2</sub>H). <sup>13</sup>C RMN (DMSO d<sub>6</sub>) δ<sub>C</sub> ppm: 18,08 (CH<sub>3</sub>-CH), 24,94 (NC-CH-), 29,33 (CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>H), 31,89 (CH<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>H), 123,78 (CN), 174,25 (s, 1H, CO<sub>2</sub>H). IR (CHCl<sub>3</sub>) cm<sup>-1</sup>: 2500-3500, 2240, 1735.

Masse FAB<sup>-</sup> (GT): m/e (intensité relative) 126 (100), 54 (5).

Les résultats des exemples 4.1 à 4.5 sont compilés dans le Tableau 3 ci-dessous.

**Tableau 3: Hydrolyse enzymatique de composés dinitriles**

Substrat	Temps de réaction (h)	Conversion (%) <sup>a</sup>	Rendement (%) <sup>b</sup>
10	51	89	87
11	53	91	90
12	25	100	72
13	25	98	82
14	96	92	91

<sup>a</sup> % conversion du dinitrile

<sup>b</sup> Rendement en monoacide obtenu après purification

**Revendications**

1- Procédé de préparation d'acides carboxyliques aliphatiques, à l'exception de l'hydroxyanalogue de la méthionine, par hydrolyse enzymatique de composés nitriles aliphatiques, à l'exception du 2-hydroxy 4-méthylthio butyronitrile, caractérisé en ce que:

(a) on prépare un matériel biologique ayant une activité nitrilase, ladite activité étant obtenue à partir d'une nitrilase d'une bactérie du genre *Alcaligenes*,

(b) on immobilise ledit matériel biologique

(c) on met en présence un composé nitrile avec le matériel biologique ainsi immobilisé, pour obtenir le sel d'ammonium de l'acide carboxylique aliphatique formé

(d) éventuellement, on purifie l'acide formé

2- Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'activité nitrilase est obtenue à partir de la nitrilase de la bactérie *Alcaligenes faecalis* ATCC8750

3 - Procédé selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que le matériel biologique consiste en un microorganisme hôte transformé exprimant une activité nitrilase recombinante

4 - Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que le microorganisme hôte est la bactérie *Escherichia coli* exprimant le gène nitB d'*Alcaligenes faecalis* ATCC 8750

5- Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que les composés nitriles aliphatiques sont des dérivés O-substitués du 2-hydroxy 4-méthylthio butyronitrile et que les acides formés sont des dérivés O-substitués de l'hydroxyanalogue de la méthionine

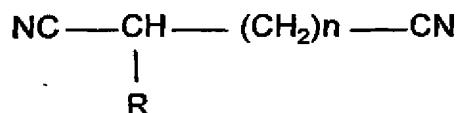
6- Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que les dérivés O-substitués du 2-hydroxy 4-méthylthio butyronitrile sont des dérivés O-acétylés ou O-hydroxyalkylés

7- Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que les composés nitriles aliphatiques sont des nitriles multi-fonctionnels sélectionnés parmi les nitriles aliphatiques, les nitriles vinyliques, les nitrile-esters, les nitrile-ester allyliques, et les nitrile-éther

8- Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que les composés nitriles aliphatiques sont des dinitriles aliphatiques symétriques ou dissymétriques et que les acides formés sont des cyanoacides

5 9- Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que les dinitriles aliphatiques symétriques sont sélectionnés parmi le malononitrile, l'adiponitrile, le fumaronitrile, ou le 1,4-dicyanobut-2-ène

10 10- Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que les dinitriles aliphatiques dissymétriques sont des 2-alkyl ou des 2-aryl dinitriles aliphatiques de structure générale:



dans laquelle: n est un nombre entier quelconque, et

15 R est un groupe alkyl, un groupe aryl ou une chaîne multifonctionnelle

11- Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que les dinitriles aliphatiques dissymétriques sont le 2-méthylglutaronitrile, le 2-méthylsuccinonitrile, ou le 2-méthyladiponitrile

20

12- Procédé selon l'une des revendications 1 à 11, caractérisé en ce que le matériel biologique de l'étape (a) est immobilisé sur un support solide.

25 13- Procédé selon la revendication 12, caractérisé en ce que le support solide a une granulométrie comprise entre 1 µm et 500 µm, de préférence 10 µm et 200 µm, et en ce qu'il constitue de 0,01 à 200 %, de préférence 10 à 100 % en poids du matériel biologique.

14- Procédé selon l'une des revendications 12 ou 13, caractérisé en ce que le support solide est choisi parmi:

- 30
- les résines échangeuses d'ions,
  - l'alumine,

- les silices de synthèse ou diatomées et les gels de silice,
- les zéolites,
- les charbons,
- les protéines partiellement solubles ou insolubles dans l'eau, et
- les polysaccharides.

5

15 - Procédé selon la revendication 16, caractérisé en ce que le support solide est le gluten.

10

16- Procédé selon l'une des revendications 1 à 15 caractérisé en ce que le rapport entre la masse de matériel biologique immobilisé et la masse de substrat est de 0,1 et 10

17- Procédé selon l'une des revendications 12 à 16, caractérisé en ce que le matériel biologique immobilisé est formulé selon une méthode de pelliculage

15

18- Procédé selon l'une des revendications 1 à 19, caractérisé en ce que l'étape (c) est réalisée dans une ou plusieurs colonnes ou réacteurs

20

19- Procédé selon la revendication 18, caractérisé en ce que la ou les colonnes ou réacteurs sont mis en œuvre à une température comprise entre 10 et 60°C

20- Procédé selon l'une des revendications 18 ou 19, caractérisé en ce que la ou les colonnes ou réacteurs sont mis en œuvre à un pH compris entre 5 et 9

25

30

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
28 novembre 2002 (28.11.2002)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
WO 02/095045 A3

(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> : C12P 7/40,  
13/00, C12N 11/00, 9/78 // (C12P 7/40, C12R 1:05)  
(C12P 13/00, C12R 1:05)

(21) Numéro de la demande internationale :  
PCT/FR02/01665

(22) Date de dépôt international : 17 mai 2002 (17.05.2002)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :  
01/06665 21 mai 2001 (21.05.2001) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : ADIS-  
SEO FRANCE S.A.S. [FR/FR]; 42, avenue Aristide  
Briand, F-92160 Antony (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : GROS,  
Georges [FR/FR]; 25, rue du Jubilé, F-92160 Antony  
(FR). GARRAIT, Michel [FR/FR]; 1448 route de  
Coutois, F-69390 Millery (FR). TAILLADES, Jacques  
[FR/FR]; 9, rue des Erables, F-34830 Clapiers (FR). REY,  
Patrick [FR/FR]; route de Clermont l'Hérault, F-34800  
Moureze (FR).

(74) Mandataire : CABINET GERMAIN & MAUREAU;  
B.P. 6153, F-69466 Lyon Cedex 06 (FR).

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,  
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,  
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,  
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,  
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,  
MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI,  
SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN,  
YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,  
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet  
eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet  
européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR,  
IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ,  
CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN,  
TD, TG).

**Déclarations en vertu de la règle 4.17 :**

— relative au droit du déposant de demander et d'obtenir un  
brevet (règle 4.17.ii) pour les désignations suivantes AE,  
AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH,  
CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI,  
GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG,  
KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,  
MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD,  
SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ,  
VN, YU, ZA, ZM, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW,  
MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet eurasien (AM,  
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT,  
BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC,  
NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,  
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

— relative au droit du déposant de revendiquer la priorité de  
la demande antérieure (règle 4.17.iii) pour les désigna-  
tions suivantes AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,  
BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,  
DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID,  
IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,  
LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ,  
OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM,  
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW, brevet  
ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG,  
ZM, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU,  
TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI,  
FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI  
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE,  
SN, TD, TG)

[Suite sur la page suivante]

(54) Title: METHOD OF PREPARING ALIPHATIC CARBOXYLIC ACIDS BY ENZYMATIC HYDROLYSIS OF ALIPHATIC  
NITRILE COMPOUNDS

(54) Titre : PROCEDE DE PREPARATION D'ACIDES CARBOXYLIQUES ALIPHATIQUES PAR HYDROLYSE ENZYMA-  
TIQUE DE COMPOSES NITRILES ALIPHATIQUES

(57) Abstract: The invention relates to a novel method of preparing aliphatic carboxylic acids by enzymatic hydrolysis of aliphatic  
nitrile compounds. The inventive method is characterised in that: (a) a biological material having a nitrilase activity is prepared; (b)  
said biological material is immobilised; (c) a nitrile compound is brought into contact with the biological material thus immobilised  
in order to obtain the ammonium salt of the aliphatic carboxylic acid formed; and (d), optionally, the acid formed is purified.

(57) Abrégé : La présente invention concerne un nouveau procédé de préparation d'acides carboxyliques aliphatiques par hydrolyse  
enzymatique de composés nitriles aliphatiques caractérisé en ce que: (a) on prépare un matériel biologique ayant une activité nitrilase,  
(b) on immobilise ledit matériel biologique (c) on met en présence un composé nitrile avec le matériel biologique ainsi immobilisé,  
pour obtenir le sel d'ammonium de l'acide carboxylique aliphatique formé (d) éventuellement, on purifie l'acide formé.

WO 02/095045 A3

- En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.*

— avec rapport de recherche internationale

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/FR 02/01665

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12P7/40 C12P13/00 C12N11/00 C12N9/78 //(C12P7/40,  
C12R1:05), (C12P13/00, C12R1:05)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12P C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, CHEM ABS Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>YAMAMOTO K ET AL: "PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF THE NITRILASE FROM ALCALIGENES FAECALIS ATCC 8750 RESPONSIBLE FOR ENANTIOSELECTIVE HYDROLYSIS OF MANDELONITRILE"</p> <p>JOURNAL OF FERMENTATION AND BIOENGINEERING, SOCIETY OF FERMENTATION TECHNOLOGY, JP, vol. 73, no. 6, 1992, pages 425-430, XP000881149 ISSN: 0922-338X cited in the application page 427, right-hand column -page 428, left-hand column; table 3 abstract</p> <p style="text-align: center;">--- -/-</p>	1-4, 7-9, 12-20

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*G\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 June 2003

Date of mailing of the international search report

25/06/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Devijver, K

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/FR 02/01665

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 98 18941 A (RHONE POULENC NUTRITION ANIMAL) 7 May 1998 (1998-05-07) cited in the application the whole document	1-20
X	GAVAGAN J E ET AL: "A GRAM-NEGATIVE BACTERIUM PRODUCING A HEAT-STABLE NITRILASE HIGHLY ACTIVE ON ALIPHATIC DINITRILES" APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, SPRINGER VERLAG, BERLIN, DE, vol. 52, November 1999 (1999-11), pages 654-659, XP000964621 ISSN: 0175-7598 abstract; table 1 page 658, left-hand column, line 12 - line 15	10,11
X	US 5 908 954 A (GAVAGAN JOHN EDWARD ET AL) 1 June 1999 (1999-06-01) column 5, line 16 - line 42 column 16, line 5 - line 12 column 18, line 15 - line 67; examples 1,10,17,19,21,23 column 2, line 30 - line 33	10,11
X	WO 01 34786 A (AVENTIS ANIMAL NUTRITION SA; FAVRE BULLE OLIVIER (FR); JOURDAT CAT) 17 May 2001 (2001-05-17) page 1-2; example 6	1-4,7, 12-20
A	KOBAYASHI M ET AL: "VERSATILE NITRILASES: NITRILE-HYDROLYSING ENZYMES" FEMS MICROBIOLOGY LETTERS, AMSTERDAM, NL, vol. 120, no. 3, 1994, pages 217-223, XP001052644 ISSN: 0378-1097 page 219, right-hand column; table 1 page 221, left-hand column	1-20
A	LEVY-SCHIL S ET AL: "Aliphatic nitrilase from a soil-isolated Comamonas testosteroni sp.: gene cloning and overexpression, purification and primary structure" GENE, ELSEVIER BIOMEDICAL PRESS, AMSTERDAM, NL, vol. 161, no. 1, 8 August 1995 (1995-08-08), pages 15-20, XP004042111 ISSN: 0378-1119 cited in the application abstract	1-20

-/--



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/FR 02/01665

## C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KLEMPIER N ET AL: "SELECTIVE TRANSFORMATION OF NITRILES INTO AMIDES AND CARBOXYLIC ACIDS BY AN IMMOBILIZED NITRILASE" TETRAHEDRON LETTERS, vol. 32, no. 3, 1991, pages 341-344, XP002192515 ISSN: 0040-4039 cited in the application the whole document	1-20
A	WO 98 32872 A (NOVUS INT INC) 30 July 1998 (1998-07-30) page 2, line 15 - line 25; claims 1-54	1-20

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In ion on patent family members

Internat Application No

PCT/FR 02/01665

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9818941	A	07-05-1998	FR 2755143 A1	30-04-1998
			AU 738160 B2	13-09-2001
			AU 4951397 A	22-05-1998
			BR 9712558 A	19-10-1999
			CN 1234074 A	03-11-1999
			CZ 9901454 A3	11-08-1999
			EP 0934419 A1	11-08-1999
			WO 9818941 A1	07-05-1998
			HU 9904513 A2	28-05-2000
			JP 2001502908 T	06-03-2001
			KR 2000052732 A	25-08-2000
			NZ 335332 A	24-11-2000
			PL 332958 A1	25-10-1999
			US 6180359 B1	30-01-2001
US 5908954	A	01-06-1999	US 5858736 A	12-01-1999
			CA 2254902 A1	27-11-1997
			CN 1219167 A	09-06-1999
			EP 0901468 A1	17-03-1999
			KR 2000011091 A	25-02-2000
			WO 9744318 A1	27-11-1997
			US 5936114 A	10-08-1999
			US 6077955 A	20-06-2000
			US 5922589 A	13-07-1999
			US 5814508 A	29-09-1998
			US 6066490 A	23-05-2000
WO 0134786	A	17-05-2001	FR 2800749 A1	11-05-2001
			AU 1284501 A	06-06-2001
			CA 2390008 A1	17-05-2001
			CN 1420925 T	28-05-2003
			EP 1228198 A1	07-08-2002
			WO 0134786 A1	17-05-2001
WO 9832872	A	30-07-1998	US 5866379 A	02-02-1999
			AU 6135898 A	18-08-1998
			EP 0972066 A1	19-01-2000
			WO 9832872 A1	30-07-1998

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/FR 02/01665

## A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 C12P7/40 C12P13/00 C12N11/00 C12N9/78 //(C12P7/40,  
C12R1:05),(C12P13/00,C12R1:05)

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C12P C12N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, CHEM ABS Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	YAMAMOTO K ET AL: "PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF THE NITRILASE FROM ALCALIGENES FAECALIS ATCC 8750 RESPONSIBLE FOR ENANTIOSELECTIVE HYDROLYSIS OF MANDELONITRILE" JOURNAL OF FERMENTATION AND BIOENGINEERING, SOCIETY OF FERMENTATION TECHNOLOGY, JP, vol. 73, no. 6, 1992, pages 425-430, XP000881149 ISSN: 0922-338X cité dans la demande page 427, colonne de droite -page 428, colonne de gauche; tableau 3 abrégé  --  -/-	1-4, 7-9, 12-20

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

## \* Catégories spéciales de documents cités:

- \*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- \*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- \*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- \*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- \*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- \*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- \*X\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- \*Y\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- \*Z\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

13 juin 2003

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

25/06/2003

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Devijver, K

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO 98 18941 A (RHONE POULENC NUTRITION ANIMAL) 7 mai 1998 (1998-05-07) cité dans la demande le document en entier	1-20
X	GAVAGAN J E ET AL: "A GRAM-NEGATIVE BACTERIUM PRODUCING A HEAT-STABLE NITRILASE HIGHLY ACTIVE ON ALIPHATIC DINITRILES" APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, SPRINGER VERLAG, BERLIN, DE, vol. 52, novembre 1999 (1999-11), pages 654-659, XP000964621 ISSN: 0175-7598 abrégé; tableau 1 page 658, colonne de gauche, ligne 12 - ligne 15	10,11
X	US 5 908 954 A (GAVAGAN JOHN EDWARD ET AL) 1 juin 1999 (1999-06-01) colonne 5, ligne 16 - ligne 42 colonne 16, ligne 5 - ligne 12 colonne 18, ligne 15 - ligne 67; exemples 1,10,17,19,21,23 colonne 2, ligne 30 - ligne 33	10,11
X	WO 01 34786 A (AVENTIS ANIMAL NUTRITION SA ; FAVRE BULLE OLIVIER (FR); JOURDAT CAT) 17 mai 2001 (2001-05-17) page 1-2; exemple 6	1-4,7, 12-20
A	KOBAYASHI M ET AL: "VERSATILE NITRILASES: NITRILE-HYDROLYSING ENZYMES" FEMS MICROBIOLOGY LETTERS, AMSTERDAM, NL, vol. 120, no. 3, 1994, pages 217-223, XP001052644 ISSN: 0378-1097 page 219, colonne de droite; tableau 1 page 221, colonne de gauche	1-20
A	LEVY-SCHIL S ET AL: "Aliphatic nitrilase from a soil-isolated <i>Comamonas testosteroni</i> sp.: gene cloning and overexpression, purification and primary structure" GENE, ELSEVIER BIOMEDICAL PRESS. AMSTERDAM, NL, vol. 161, no. 1, 8 août 1995 (1995-08-08), pages 15-20, XP004042111 ISSN: 0378-1119 cité dans la demande abrégé	1-20

-/-

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	KLEMPIER N ET AL: "SELECTIVE TRANSFORMATION OF NITRILES INTO AMIDES AND CARBOXYLIC ACIDS BY AN IMMOBILIZED NITRILASE" TETRAHEDRON LETTERS, vol. 32, no. 3, 1991, pages 341-344, XP002192515 ISSN: 0040-4039 cité dans la demande le document en entier	1-20
A	WO 98 32872 A (NOVUS INT INC) 30 juillet 1998 (1998-07-30) page 2, ligne 15 - ligne 25; revendications 1-54	1-20

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux familles de brevets

Demande internationale No

PCT/FR 02/01665

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9818941	A	07-05-1998	FR 2755143 A1	30-04-1998
			AU 738160 B2	13-09-2001
			AU 4951397 A	22-05-1998
			BR 9712558 A	19-10-1999
			CN 1234074 A	03-11-1999
			CZ 9901454 A3	11-08-1999
			EP 0934419 A1	11-08-1999
			WO 9818941 A1	07-05-1998
			HU 9904513 A2	28-05-2000
			JP 2001502908 T	06-03-2001
			KR 2000052732 A	25-08-2000
			NZ 335332 A	24-11-2000
			PL 332958 A1	25-10-1999
			US 6180359 B1	30-01-2001
US 5908954	A	01-06-1999	US 5858736 A	12-01-1999
			CA 2254902 A1	27-11-1997
			CN 1219167 A	09-06-1999
			EP 0901468 A1	17-03-1999
			KR 2000011091 A	25-02-2000
			WO 9744318 A1	27-11-1997
			US 5936114 A	10-08-1999
			US 6077955 A	20-06-2000
			US 5922589 A	13-07-1999
			US 5814508 A	29-09-1998
WO 0134786	A	17-05-2001	US 6066490 A	23-05-2000
			FR 2800749 A1	11-05-2001
			AU 1284501 A	06-06-2001
			CA 2390008 A1	17-05-2001
			CN 1420925 T	28-05-2003
			EP 1228198 A1	07-08-2002
WO 9832872	A	30-07-1998	WO 0134786 A1	17-05-2001
			US 5866379 A	02-02-1999
			AU 6135898 A	18-08-1998
			EP 0972066 A1	19-01-2000
			WO 9832872 A1	30-07-1998